

INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM CAPRINOS COM *MYCOBACTERIUM PARATUBERCULOSIS* DE ORIGEM BOVINA

EXPERIMENTAL INFECTION IN GOATS WITH *MYCOBACTERIUM PARATUBERCULOSIS* OF BOVINE ORIGIN

Fernando Padilla Poester¹

Ernani Tadeu Ramos²

RESUMO

Uma amostra de *Mycobacterium paratuberculosis* de origem bovina foi experimentalmente inoculada por via oral em caprinos. Após três anos de observação, os autores obtiveram a reprodução da infecção em dois dos três caprinos inoculados, concluindo que os caprinos são suscetíveis a amostras bovinas de *M. paratuberculosis*. A possibilidade de transmissão intra-uterina da bactéria, embora tentada não foi possível de ser demonstrada.

Palavras-chave: paratuberculose, caprinos, infecção experimental.

SUMMARY

A strain of *Mycobacterium paratuberculosis* of bovine origin was experimentally inoculated *per os* in goats. After an observation period of three years, it was possible to demonstrate that two out of three goats became infected with the bacteria. The intra-uterine infection was tried without success.

Key words: paratuberculosis, goats, experimental infection.

INTRODUÇÃO

A Paratuberculose (Doença de Johne) é uma enfermidade infecciosa crônica e debilitante que afeta de forma natural os ruminantes, causada pelo *Mycobacterium paratuberculosis* (MERKAL, 1984).

É uma doença de disseminação lenta, cujos sinais clínicos aparecem depois de um prolongado período de incubação (KREEGER, 1991). Segundo DELISLE et al. (1980), quando um animal doente é detectado num rebanho, 38 a 42% dos animais podem já estar infectados.

A enfermidade é adquirida, primordialmente, pela ingestão da bactéria que se localiza e se multiplica na mucosa do intestino delgado e linfonodos anexos, produzindo uma resposta granulomatosa de intensidade variável, onde pode ser evidenciada a presença de grande número de histiócitos e macrófagos epitelióides (BUERGELT et al., 1978).

O *M. paratuberculosis*, uma vez no intestino delgado, multiplica-se lentamente, originando uma infiltração celular maciça da submucosa intestinal, resultando numa diminuição da absorção alimentar,

¹Médico Veterinário, Mestre, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Caixa Postal 2076, 90001-970 - Porto Alegre, RS.

²Médico Veterinário, Especialista, IPVDF.

diarréia crônica e profusa, acompanhada de perda de peso progressiva e debilitação (BLOOD et al., 1979).

Entre os caprinos raramente ocorre diarréia e a perda de peso é o único sinal clínico nem sempre específico da doença (FUENTEALBA et al., 1985).

A Paratuberculose é uma doença que tem sido relatada como presente num grande número de países, mas nem todos têm conduzido estudos sistemáticos para determinar a sua importância econômica.

Segundo MERKAL (1984), a Paratuberculose tem sido considerada a mais importante doença infecciosa dos bovinos na Grã-Bretanha. Nos Estados Unidos ela ocorre em todas as áreas com grandes concentrações de gado bovino (KOPECKY, 1973). Um levantamento sorológico efetuado na Flórida indicou que a infecção está disseminada nos rebanhos de corte e de leite nas proporções de 8,6% e 17,1%, respectivamente (BRAUN et al., 1990). Numa pesquisa realizada por WILSON et al. (1993) ficou comprovada a associação do *M. paratuberculosis* com a diminuição da produção de leite.

No Brasil, os relatos sobre esta enfermidade são bastante escassos. A primeira publicação científica sobre a ocorrência da Paratuberculose foi feita por SANTOS & SILVA (1956). Há relatos sobre o seu diagnóstico nos estados do Rio de Janeiro (SILVA & PIZELLI, 1961), Santa Catarina (PORTUGAL et al., 1979) e Rio Grande do Sul (RAMOS et al., 1986).

Muitos testes têm sido desenvolvidos para auxiliar no diagnóstico da Paratuberculose. No entanto, o único teste considerado como definitivo é o isolamento do agente de tecidos ou fezes (COLGROVE et al., 1989). Segundo WHIPPLE et al. (1991), a não padronização dos procedimentos bacterianos de isolamento do *M. paratuberculosis* tem contribuído para dificultar o diagnóstico desta enfermidade.

A infecção experimental por via oral de ovinos com *M. paratuberculosis* de origem bovina foi obtida com sucesso por SILVA (1968), constatando, inclusive, infecção por via placentária.

Segundo DOYLE (1959), cabras jovens são muito suscetíveis à infecção natural ou artificial com *M. paratuberculosis*. RUSSEL & MILNER (1979), embora tenham demonstrado que exista semelhança sorológica entre amostras caprinas e bovinas de *M. paratuberculosis*, sugerem que a patogenidade de amostras caprinas para bovinos permanece incerta.

O objetivo do presente trabalho é demonstrar a suscetibilidade de caprinos ao *M. paratuberculosis*, inoculados experimentalmente por via oral com emulsão de mucosa intestinal lesada obtida de um bovino com Paratuberculose.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o preparo do inóculo, utilizou-se emulsão de mucosa intestinal proveniente de um bovino do qual se isolou a bactéria.

Preparo do inóculo

Preparou-se um raspado de mucosa intestinal de zonas com lesões típicas. A massa de tecido intestinal foi emulsionada com salina fisiológica estéril num total de 210ml. Cada animal recebeu 70ml por via oral mediante aplicação com funil acoplado a uma mangueira de borracha. Deste modo, não houve nenhuma perda de material inoculante.

Animais inoculados

Foram inoculados três caprinos adultos, sendo um macho castrado e duas fêmeas. Uma das fêmeas estava prenhe quando da inoculação. Com isto, procurou-se avaliar a possibilidade da transmissão intra-uterina do agente. Os animais foram mantidos num mesmo box, sem contato com outros animais, por um período de três anos, que foi o tempo de duração do experimento. A alimentação administrada foi ração e pasto verde.

Testes empregados

Provas alérgicas

Antes da inoculação, os animais foram submetidos ao teste intradérmico com jonina^a. Sessenta dias depois da inoculação, os animais foram novamente submetidos à prova da jonina na prega ano-caudal.

Exames necroscópicos

Foram realizadas necropsias dos animais para pesquisa de lesões macroscópicas de Paratuberculose e coletado material para exames bacteriológicos e histológicos.

Exames histológicos

Fragmentos de intestino, fígado e linfonodos mesentéricos foram fixados em formol a 10%, cortados na espessura de 5 μ em parafina e corados por Hematoxilina-eosina e Ziehl-Nielsen (CULLING, 1975).

Exames bacteriológicos

Durante as necropsias coletaram-se os seguintes materiais para exame microbiológico: fezes, linfonodos mesentéricos, válvula ileo-cecal e fragmentos de intestino. Como meio de cultura, utilizou-se o meio de Herrold gema de ovo com micobactina^b, na proporção de 0,2g por litro e sem micobactina. Como descontaminante utilizou-se o Cloreto de benzalcônio^c na proporção de 0,1% para tecidos e 0,3% para fezes, segundo CEPANZO (1953) e LARSEN et al. (1981).

RESULTADOS

Provas alérgicas

Antes da inoculação, os animais submetidos ao teste alérgico da jonina, foram todos negativos 72 horas após a aplicação. Sessenta dias após a inoculação, os animais foram novamente submetidos ao teste. Quarenta e oito horas após verificou-se reação positiva em todos os animais. O macho revelou a maior reação, tendo o edema apresentado um volume aproximado ao de um ovo de galinha. As fêmeas apresentaram um edema menor, mas suficiente para considerá-las positivas. Nas 72 horas, os edemas de todos os animais haviam diminuído de tamanho.

Necropsias

Dois anos após a inoculação, o macho e a fêmea não prenhe apresentaram emagrecimento progressivo sem diarreia que culminou com a morte de ambos. À necropsia não se verificaram alterações macroscópicas significativas nos linfonodos mesentéricos, intestinos ou fígado. A outra fêmea e seu filhote apresentaram apenas discreto emagrecimento e em nenhum momento durante o período em que durou o experimento verificou-se presença de diarreia. Ao final do terceiro ano, a fêmea remanescente e o filhote foram sacrificados e necropsiados. Também nesses animais não se verificaram lesões macroscópicas significativas.

Exames histopatológicos

O resultado do exame histopatológico do macho e da fêmea que morreram ao final do segundo ano de inoculação revelou intensa degeneração gordurosa no fígado. No intestino observaram-se áreas

de infiltração de células mononucleares na lâmina própria e grande número de macrófagos carregados de bacilos álcool-ácido resistentes. Os exames efetuados na fêmea remanescente e no seu filhote não revelaram alterações histopatológicas significativas.

Exames bacteriológicos

O isolamento do *M. paratuberculosis* foi obtido a partir da sementeira de linfonodos mesentéricos e de raspado de intestino dos animais que morreram com sinais típicos da doença, como perda de peso e intensa debilitação (macho e uma fêmea). Ao redor da quinta semana após incubação a 37°C em meio de Herrold com gema de ovo e enriquecido com micobactina, verificou-se o aparecimento de colônias típicas de *M. paratuberculosis*. Nos meios sem micobactina não houve crescimento bacteriano. Dos animais que foram sacrificados, (fêmea e filhote), não foi possível obter-se isolamento bacteriano dos órgãos semeados em nenhum dos meios empregados.

A identificação bacteriana baseou-se no prolongado tempo de aparição das colônias, morfologia colonial (incolores, translúcidas, lisas, brilhantes, pequenas) com características de bacilos álcool-ácido resistentes e na dependência à micobactina.

DISCUSSÃO

A Paratuberculose é uma enfermidade que ocorre naturalmente em ruminantes, embora o seu agente etiológico tenha sido isolado de animais monogástricos em matadouros como suínos e eqüinos sem sinais clínicos da doença (MERKAL, 1984).

A infecção experimental de caprinos com amostras bovinas de *M. paratuberculosis* não pode ser considerada como um fato absolutamente inédito. Segundo DOYLE (1959), caprinos têm sido usados em trabalhos como animais de experimentação. De acordo com RUSSEL & MILNER (1979), há uma similaridade sorológica bastante acentuada entre amostras de *M. paratuberculosis* de origem bovina e caprina, muito embora GILMOUR (1976) tenha demonstrado a existência de diferenças antigênicas entre pelo menos duas amostras desta bactéria.

O presente trabalho teve como objetivos reproduzir a Paratuberculose em caprinos com amostra isolada de bovino, o que foi obtido em dois dos três animais inoculados, bem como verificar a possibilidade da transmissão intra-uterina da bactéria.

Lesões macroscópicas como mucosa corrugada e a presença de diarreia que são típicas da doença em bovinos, não foram detectadas no presente estudo. Estas observações estão de acordo com os resultados de FODSTAD & GUNNARSSON (1979) que concluíram serem esses achados de pouco valor para o diagnóstico da enfermidade em caprinos.

A identificação do *M. paratuberculosis* a partir de tecidos fixados em formol, em preparações com parafina e corados pelo método de Ziehl-Neelsen, tem sido tradicionalmente recomendada como método adicional no diagnóstico da Paratuberculose (CULLING, 1975; CHIODINI et al., 1984). Este procedimento, no entanto, apresenta uma sensibilidade menor quando comparado, por exemplo, com métodos imunohistoquímicos, os quais são capazes de detectar pequenos números de bactérias nos tecidos afetados (MASSONE et al., 1991). A pouca sensibilidade do teste histológico empregado poderia explicar o diagnóstico negativo em uma das fêmeas inoculadas.

A infecção intra-uterina tem sido relatada como freqüente em bovinos (DOYLE, 1959) e em inoculação experimental em ovinos com amostra bovina (SILVA, 1968). Embora esse tipo de transmissão não tenha sido comprovado no presente experimento, isto não significa que ele não ocorra em caprinos. A pequena amostragem estudada pode ter sido responsável pela não constatação da transmissão por esta via.

CONCLUSÕES

1. Foi possível infectar-se caprinos com amostra bovina de *M. paratuberculosis*.
2. A Paratuberculose em caprinos foi obtida em dois dos três animais inoculados por via oral.
3. No presente experimento não foi possível determinar-se a infecção intra-uterina.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Luiz C.B. Fallavena pela realização dos exames histopatológicos.

FONTES DE AQUISIÇÃO

- a - CVL-Central Veterinary Laboratory - Weybridge - Inglaterra.
 b - ALLIED LABORATORIES, INC. PO Box 1063. Ames. IA 50010.
 c - MERCK - QUIMITRA. Rua D. Leopoldina, 366. Porto Alegre, RS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BLOOD, D.C., HENDERSON, J.A., RADOSTITS, O.M. **Veterinary Medicine**. 5. ed. London: Ballière Tindall, 1979. 1135 p.
- BRAUN, R.K., BUERGELT, C.D., LITTEL, R.C. Use of ELISA to estimate prevalence of paratuberculosis in cattle of Florida. **J Amer Vet Med Assoc**, v. 196, p. 1251-1254, 1990.
- BUERGELT, C.D., HALL, C., McENTEE, K. et al. Pathologic evaluation of paratuberculosis in naturally infected cattle. **Vet Pathol**, v. 15, p. 196-207, 1978.
- CEPANZO. **Aislamiento e identificación de micobacterias**. Série de Monografias Científicas y Técnicas, CPZ-6. Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud, 1973. 26 p.
- CHIODINI, R.J., VAN KRUIJNINGEN, H., MERKAL, R.S. Paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. **Cornell Vet**, v. 74, p. 218-262, 1984.
- COLGROVE, G.S., THOEN, C.O., BLACKBURN, B.O. et al. Paratuberculosis in cattle: a comparison of three serologic tests with results of fecal cultures. **Vet Microbiol**, v. 19, p. 183-187, 1989.
- CULLING, C.F.A. **Handbook of histopathology and histochemical techniques**. 3. ed. London and Boston: Butterworths, 1975. 712 p.
- DELISLE, G.W., SAMAGH, B.S., DUNCAN, J.R. Bovine paratuberculosis. II - A comparison of fecal culture and antibody response. **Can J Comp Med**, v. 4, p. 183-191, 1980.
- DOYLE, T.M. Johne's disease. In: STABLEFORTH, A.M., GALLOWAY, I.A. **Infectious diseases of animals-diseases due to bacteria**. London: Butterworths, 1959. cap. 9. p. 319-345.
- FODSTAD, F.H., GUNNARSSON, E. Post-mortem examination in the diagnosis of Johne's disease in goats. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 20, n. 2, p. 157-167, 1979.
- FUENTEALBA, I., ILLANES, O., DEL CAMPO, C.H. et al. Paratuberculosis caprina: histopatologia de tres casos diagnosticados en Valdivia. **Arch Med Vet**, Chile, v. 16, n. 2, p. 103-106, 1985.
- GILMOUR, N.J.L. The specificity of the fluorescent antibody test using the sera of rabbits inoculated with strains of mycobacteria. **Res Vet Sci**, v. 20, p. 1-5, 1976.
- KOPECKY, K.E. Distribution of bovine paratuberculosis in the United States. **J Amer Vet Med Assoc**, v. 162, p. 787-788, 1973.
- KREEGER, J.M. Ruminant paratuberculosis - a century of progress and frustration. **Vet Diagn Invest**, v. 3, p. 373-383, 1991.
- LARSEN, A.B., STALHEIM, O.H.V., HUGHES, D.E. et al. *Mycobacterium paratuberculosis* in the semen and genital organs of a semen-donor bull. **J Vet Med Assoc**, v. 179, n. 2, p. 169-171, 1981.
- MASSONE, A.R., ITAGAKI, S., IBARGOYEN, G.S. et al. Demonstration of *Mycobacterium paratuberculosis* in tissue sections: comparative studies of histological and immunohistochemical methods. **Isr J Vet Med**, v. 46, p. 48-50, 1991.

- MERKAL, R.S. Paratuberculosis. In: KUBICA, G.P., WAYNE, L.G. **The mycobacteria. A sourcebook.** New York and Basel: Marcel Dekker, Inc, 1984. cap. 50. p. 1237-1249.
- PORTUGAL, M.A.S.C., PIMENTEL, J.N., SALIBA, A.M. et al. Ocorrência de paratuberculose no estado de Santa Catarina. **O Biológico**, São Paulo, v. 45, p. 19-24, 1979.
- RAMOS, E.T., POESTER, F.P., CORREA, B.L., et al. Paratuberculose em bovinos no estado do Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, Porto Alegre, v. 34, p. 28-32, 1986.
- RUSSEL, E.G., MILNER, A.R. Serological similarity between caprine and bovine strains of *Mycobacterium paratuberculosis*. **Australian Vet J**, v.54, n. 10, p. 484-485, 1979.
- SANTOS, J.A., SILVA, N.L. Sobre a primeira observação de Paratuberculose no Brasil. **BoI Soc Bras Med Vet**, v. 24, p. 5-11, 1956.
- SILVA, N.M., PIZELLI, G.N. Estudo sobre a paratuberculose. I - Diagnóstico de um caso de doença. **Arq Inst Biol Animal**, v. 4, p. 169-173, 1961.
- SILVA, N.M. da. Estudos sobre a Paratuberculose. IV: infecção experimental de ovinos com *Mycobacterium paratuberculosis* de origem bovina. **Pesq Agrop Bras**, v. 3, p. 285-289, 1968.
- WHIPPLE, D.L., CALLIHAN, D.R., JARNAGIN, J.L. Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. **J Vet Diagn Invest**, v. 3, p. 368-373, 1991.
- WILSON, D.J., ROSSITER, C., HAN, H.R., et al. Association of *Mycobacterium paratuberculosis* infection with reduced mastitis but with decreased milk production and increased cull rate in clinically normal dairy cows. **Am J Vet Res**, v. 54, n. 11, p.1851-1857, 1993.